

ORSAY
Série A
n° d'ordre : 617

PARTICULARITES DE LA GLYCOLYSE
ET DE SA REGULATION AU SEIN DU
LATEX D'HEVEA BRASILIENSIS

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie la thèse de.
Doctorat ès Sciences naturelles
enregistrée au CNRS sous le n° AO 4129

de Monsieur JACOB Jean-Louis

soutenue le 11 mai 1970 à la
Faculté des Sciences d'Orsay

devant le Jury :

MM. MOYSE, Président
LIORET
CLAUSER
d'AUZAC

Digitized by the Internet Archive
in 2026



Particularités de la glycolyse et de sa régulation au sein du latex d'*Hevea brasiliensis* ⁽¹⁾

Jean-Louis JACOB

Laboratoire de Biochimie - Institut français du Caoutchouc
42, rue Scheffer, 75 - Paris-16°
(Manuscrit reçu le 30 avril 1970)

RÉSUMÉ

L'activité de toutes les étapes enzymatiques de la glycolyse, a été mesurée dans le sérum de latex *in vitro*. Les caractéristiques des principales enzymes : fructokinase, phosphofructokinase, glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, pyruvate kinase et lactate déshydrogénases sont évoquées.

Dans un sérum de latex, filtré sur « Sephadex G 25 », la glycolyse fonctionne seule à l'exclusion de tout autre processus métabolique. Les « Km apparents intégrés » de cette séquence métabolique pour le NAD, l'ATP et le magnésium sont indiqués.

Il apparaît, d'autre part, que l'activité potentielle de certaines réactions, notamment celle catalysée par l'invertase, peut contrôler l'intensité glycolytique. Le pH est capable d'influencer tant l'orientation que l'intensité de fonctionnement de la « voie des hexoses diphosphates ». L'ion magnésium joue certainement un rôle essentiel dans la régulation de la glycolyse, car il intervient dans la plupart des mécanismes mis en jeu; notamment lors des variations de concentration en ATP, calcium et citrate du latex.

L'action de ces différents effecteurs est analysée, et il apparaît que les enzymes clefs impliquées dans ces phénomènes de régulation, sont la pyruvate kinase et à un degré moindre la phosphofructokinase.

La compétition, vis-à-vis du phosphoénolpyruvate, entre la production d'oxaloacétate d'une part, et celle d'acétate ou d'acétyl coenzyme A d'autre part, est discutée.

SUMMARY

The activity of all the enzymatic steps of glycolysis has been measured within the latex serum *in vitro*. The characteristics of the main enzymes : fructokinase, phosphofructokinase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase are indicated.

In a serum of latex filtered on "Sephadex G 25 fine", the glycolysis is the only one working excluding any other metabolic process; the "integrated apparent Km" for the NAD, the ATP and the magnesium, of this catabolic sequency, are given.

It appears, in addition, that the potential activity of some reactions, specially the one catalysed by invertase, is able to control the glycolytic intensity. The

(1) Cet article constitue l'article principal d'une Thèse de Doctorat d'Etat (Sciences Naturelles) soutenue à la Faculté des Sciences d'Orsay en 1970 et enregistrée au C.N.R.S. sous le n° A.O. 4129.

pH can influence the orientation as well as the working intensity of the hexoses diphosphates pathway. The magnesium ion plays certainly an essential part in the regulation of the glycolysis since it is a major factor of the most of the mechanisms involved, mainly when concentrations in ATP, calcium and citrate vary in the latex.

The action of this different effectors is analysed, and it appears that the key enzymes involved in this regulation phenomena, are the pyruvate kinase and to a lesser extent the phosphofructokinase.

Competition, as regards phosphoenolpyruvate, between oxaloacetate production and acetate or acetyl coenzyme A production, is discussed.

ABRÉVIATIONS

ADH : alcool déshydrogénase.
 ADP : adénosine diphosphate.
 ALD : aldolase.
 AOA : acide oxaloacétique.
 ATP : adénosine triphosphate.
 CoA : coenzyme A.
 DHAP : dihydroxyacétone phosphate.
 ENO : énalase.
 F6P : fructose-6-phosphate.
 F1,6P ou Fdip : fructose-1,6-diphosphate.
 FK : fructokinase.
 GAP : glycéraldéhyde phosphate.
 GAPD ou GAPDH : glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase.
 G1P : glucose-1-phosphate.
 G6P : glucose-6-phosphate.
 GPD ou GPDH : glycérophosphate déshydrogénase.
 HK : hexokinase.
 INV : invertase.
 Km : constante de Michaelis.
 LD ou LDH : lactate déshydrogénase.
 MDH : malate déshydrogénase.
 mM : millimolaire (unité de concentration).
 NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide : forme oxydée.
 NADH : nicotinamide adénine dinucléotide : forme réduite.
 PEP : phospho-énol-pyruvate.
 PFK : phosphofructokinase.
 PGK : phosphoglycérokinase.
 PGM : phosphoglycéromutase.
 PK : pyruvate kinase.
 Pm : phosphate minéral.
 PTI : phosphotriose isomérase.
 S : substrat.
 TEA : triéthanolamine.
 UI : unité internationale.

I — INTRODUCTION

Le développement de l'hévéaculture a entraîné un certain nombre de recherches physiologiques et biochimiques dont le but est d'éclairer les processus métaboliques, qui au sein du latex, président à la production du caoutchouc. Or, le métabolisme des sucres joue un rôle important vis-à-vis de l'anabolisme

isoprénique dont le schéma est actuellement bien connu (LYNEN, 1968). En effet, c'est du catabolisme glucidique que proviennent les molécules d'acétate ou d'acétyl CoA précurseurs du cis-polyisoprène, le NADPH servant aux réductions impliquées dans cette synthèse et l'ATP nécessaire à l'obtention du pyrophosphate d'isopentényle, le fonctionnement du cycle tricarboxylique étant très peu actif dans le milieu (d'AUZAC, 1965a).

Si la voie des hexoses monophosphates est susceptible de fonctionner dans le latex d'Hévéa (BANCHI, 1966; ARREGUIN et ROCK, 1967), il est difficile d'apprécier son activité qui, de toutes manières, est faible sinon négligeable *in vitro*, vis-à-vis de la glycolyse (JACOB, 1969). La voie des hexoses diphosphates, mise en évidence par différents auteurs (d'AUZAC, 1964; BANCHI, 1966; TUPY et RESING, 1967), représente de ce fait la majeure partie du catabolisme glucidique. Le fonctionnement glycolytique peut donc influencer directement et fortement sur la synthèse isoprénique. Il en résulte que l'étude des caractéristiques de la glycolyse et des mécanismes de régulation qui y sont liés, présente un intérêt certain. Au-delà des résultats fondamentaux qui concernent un enchaînement enzymatique précis, on peut espérer mettre en évidence des facteurs limitants ou des réactions sur lesquels il est peut-être possible d'intervenir afin de modifier l'activité de ce processus métabolique dans un sens favorable à l'anabolisme isoprénique et, par extension, à la production du latex.

Nos recherches ont fait l'objet de plusieurs publications (d'AUZAC et JACOB, 1967; d'AUZAC et JACOB, 1968 *a* et *b*; JACOB et d'AUZAC, 1967 *a* et *b*; JACOB et d'AUZAC, 1968 *a* et *b*; JACOB et d'AUZAC, 1969; JACOB, d'AUZAC et LIORET, 1969). Le présent mémoire est un essai ayant pour but d'éclairer les particularités de la voie des hexoses diphosphates et de sa régulation au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*.

II — MATÉRIEL ET TECHNIQUE

A) MATÉRIEL VÉGÉTAL.

Quelques expériences ont été réalisées sur la plantation même à Bimbresso (Côte-d'Ivoire) afin de bénéficier de l'emploi d'un latex le plus frais possible. La plupart des échantillons de matériel végétal ont été recueillis et expédiés par avion dans des récipients entourés de glace; reçus 24 heures plus tard au laboratoire, ils étaient soit utilisés immédiatement, soit centrifugés à 40 000 g (à 0 °C) pendant 90 min. La phase aqueuse obtenue était prélevée, lyophilisée et conservée sous cette forme à -15 °C; elle conserve ainsi ses activités enzymatiques de nombreux mois.

B) TECHNIQUES UTILISÉES.

Les techniques utilisées pour réaliser les expériences d'incubation avec des hexoses radioactifs ou non, et la filtration du sérum de latex sur « Sephadex G 25 Fine », filtration qui permet l'élimination des substances de faibles poids moléculaires (substrats, ions et cofacteurs divers), ont été exposées dans des articles précédemment parus (d'AUZAC et JACOB, 1967; d'AUZAC et JACOB 1968a).

L'analyse des différents produits obtenus lors des expériences d'incubation avec des glucides marqués au ^{14}C fait intervenir des méthodes radiochromatographiques mono ou bidimensionnelles, soit après séparations des acides aminés, des sucres et des divers composés acides, méthodes décrites par d'AUZAC (1965a), soit directement à partir des milieux réactionnels totaux, en employant le système de solvants mis au point par CROWLEY *et al.* (1963). L'emplacement des produits radioactifs sur les chromatogrammes, découpé et placé dans une fiole contenant un « liquide scintillant », peut permettre le dosage, par scintillométrie, des substances analysées.

Les dosages enzymatiques de tous les composés intermédiaires ou finaux de la glycolyse ont été effectués en utilisant exclusivement les techniques exposées dans « *Methods of Enzymatic Analysis* » (BERGMEYER, 1963).

La détermination de l'activité potentielle de chaque enzyme glycolytique et les mesures cinétiques des principales réactions étudiées, ont été faites à l'aide de sérum de latex filtré sur « Sephadex G 25 » (assurance prise qu'aucune autre réaction n'interférerait durant le dosage) selon les méthodes et dans les conditions déjà décrites (d'AUZAC et JACOB 1968 *a* et *b*; JACOB et d'AUZAC 1967 *a* et *b*; JACOB et d'AUZAC, 1969).

III — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

A) CARACTÉRISTIQUES DE LA GLYCOLYSE AU SEIN DU LATEX D'*HEVEA BRASILIENSIS*.

Des travaux précédents (d'AUZAC et JACOB, 1967) ont montré que, dans le latex d'Hévéa, les enzymes de l'enchaînement glycolytique sont exclusivement localisées dans la phase aqueuse; de ce fait, l'étude de ce processus métabolique peut se faire en employant du sérum de latex stabilisé par lyophilisation, qui conserve, sous cette forme, ses activités enzymatiques très longtemps.

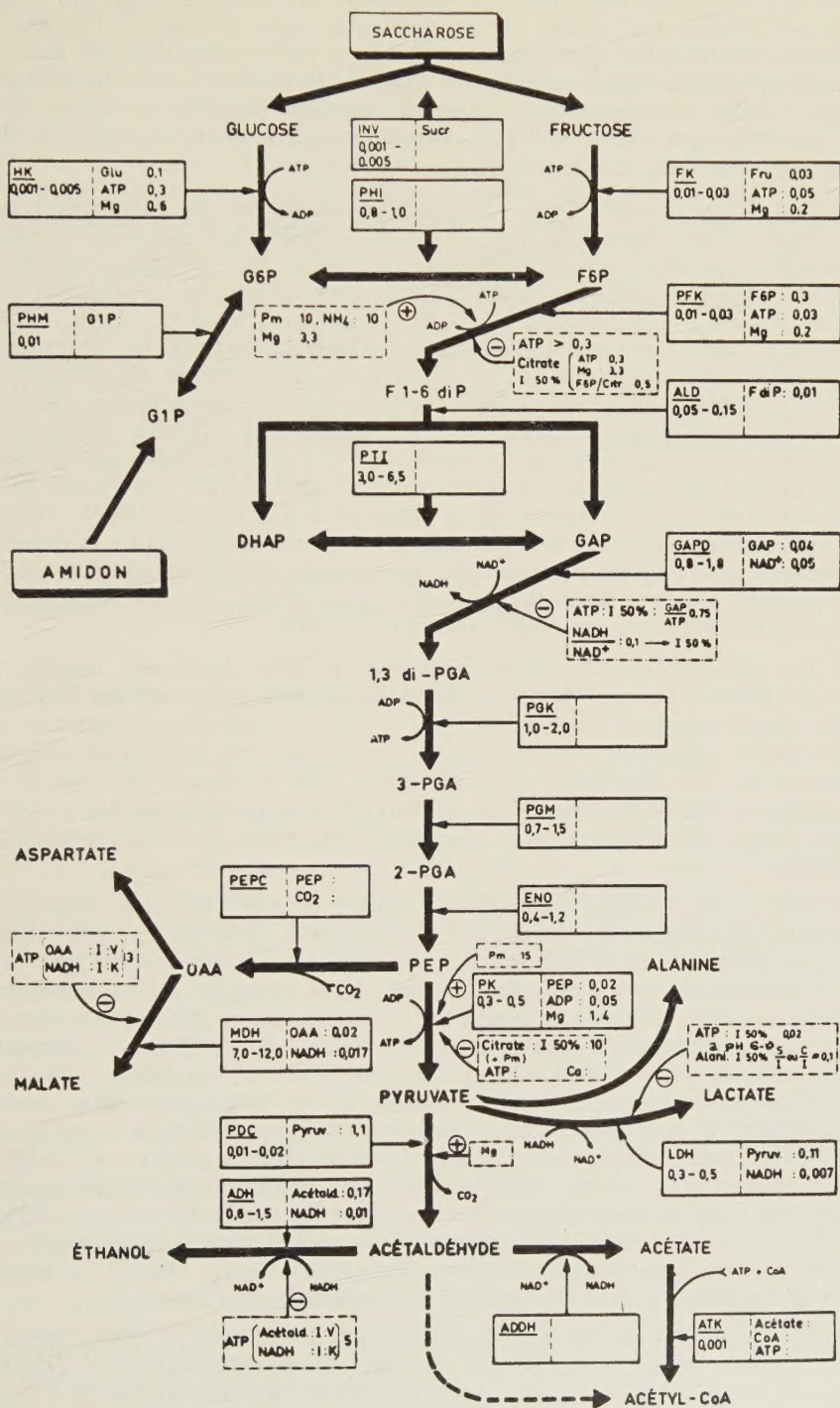
L'examen de la figure 1 permet un certain nombre de remarques.

1) En premier lieu il faut souligner l'existence d'une fructokinase (EC : 2.7.1.4) beaucoup plus active, *in vitro* du moins, que l'hexokinase de type plus

FIG. 1. — Récapitulation des caractéristiques importantes des enzymes constituant l'enchaînement glycolytique dans le latex d'*Hevea brasiliensis*.

Dans les cadres, en traits pleins, en haut à gauche et soulignés, se trouvent les initiales de l'enzyme catalysant la réaction; au-dessous la valeur de son activité potentielle exprimée en unités internationales. À droite, l'abréviation du nom ou le symbole des divers composants de la réaction, est suivi de la valeur de leur K_m exprimée en mM.

Les cadres en traits discontinus se rapportent aux effecteurs susceptibles d'influencer le fonctionnement de la réaction enzymatique. Ils sont précédés du signe + lorsqu'il s'agit d'activateurs. L'abréviation ou le symbole de ces produits est accompagné d'un nombre représentant la concentration exprimée en mM, pour laquelle l'effet observé est maximum. Ils sont précédés du signe — lorsqu'il s'agit d'inhibiteurs. L'abréviation ou le symbole de ces composés est suivie du sigle I ou I 50 % signifiant inhibition à 50 %; la lettre I peut être accompagnée de la lettre V ou K indiquant la nature de l'inhibition: V (compétitive) K (incompétitive); les conditions pour que l'inhibition atteigne 50 % sont précisées, soit par une valeur (exprimée en mM) de la concentration de ou des inhibiteurs, soit par la valeur d'un rapport de concentration entre l'inhibiteur (I) et le cofacteur (C) ou le substrat (S).



classique (EC : 2.7.1.1.) qui fonctionne également. Des travaux antérieurs (JACOB et d'AUZAC, 1967a) ont permis de montrer que cette enzyme, à l'inverse de l'hexokinase, était stable en fonction du temps de conservation du latex et étroitement spécifique de son substrat : le fructose. Par ailleurs, cette fructokinase, bien que trouvée dans quelques milieux biologiques (MEDINA et SOLS, 1956; SAPICO et ANDERSON, 1967; WOLTER, 1968) ne semble guère répandue ni dans le règne animal, ni dans le règne végétal.

2) Les caractéristiques de la phosphofructokinase ont été développées dans une publication précédente (d'AUZAC et JACOB, 1968a). A l'exception des molécules d'adénosine mono et diphosphates, l'ensemble des composés considérés comme des agents capables de modifier le fonctionnement de la phosphofructokinase en général : ATP, citrate, NH_4 , Pm (POGSON et RANDLE, 1966; DENNIS et COULTATE, 1967) peuvent effectivement influencer l'activité de l'enzyme du latex. Toutefois, les quantités d'ATP nécessaires pour inhiber sensiblement la réaction ($> 1\text{mM}$) sont beaucoup plus élevées que les concentrations physiologiques du cofacteur dans ce milieu. En effet, les dosages effectués (McMULLEN, 1960; JACOB, 1969) montrent, qu'en aucun cas, ces concentrations ne dépassent $0,3\text{ mM}$ et sont bien souvent très inférieures. Il semble que cette particularité, souvent retrouvée dans le règne végétal (DENNIS et COULTATE, 1967), s'oppose à celle qui semble caractériser le règne animal, la grande sensibilité de la phosphofructokinase à l'ATP étant sûrement une des raisons essentielles du rôle majeur joué par cette enzyme dans la régulation glycolytique des cellules animales (UNDERWOOD et NEWSHOLME, 1967; RAPOPORT, 1968).

3) La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, également étudiée par ailleurs (d'AUZAC et JACOB, 1968a), est inhibée par l'ATP et surtout par le NADH qui agit compétitivement vis-à-vis du NAD^+ . Il faut cependant remarquer que la forte activité potentielle de l'enzyme (dépassant souvent l'unité internationale) doit limiter son rôle régulateur de la glycolyse, dans la mesure où, malgré une forte inhibition, l'activité résiduelle de la réaction reste encore supérieure à celles d'autres étapes enzymatiques telles que celles catalysées par l'invertase ou la fructokinase.

4) La pyruvate kinase du sérum de latex présente certaines particularités qui semblent peu communes (JACOB et d'AUZAC, 1969). Elle est, en effet, susceptible de fonctionner à sa vitesse maximale en présence d'une quantité très faible sinon en absence de potassium. Or l'activité de la pyruvate kinase issue de la plupart des milieux biologiques, nécessite la présence de ce cation à des concentrations non négligeables (SLOANE-STANLEY, 1961). Par ailleurs, le phosphate minéral active la vitesse maximale de la réaction sans modifier l'affinité de l'enzyme pour son cofacteur ou son substrat. L'ATP qui peut, dans certains milieux, inhiber le fonctionnement de la pyruvate kinase (MOSSBERG et MAYER, 1964) n'a aucune influence, *aux concentrations physiologiques*, sur celui de l'enzyme du latex. Par contre, le citrate et le Ca^{++} peuvent s'opposer efficacement à l'activité de la pyruvate kinase de ce milieu. L'action inhibitrice de ces effecteurs a lieu à des concentrations qui peuvent être parfaitement physiologiques; les concentrations citriques peuvent dépasser 20 mM (d'AUZAC, 1965b) et celles de calcium atteindre 2 à 3 mM (NADARAJAH et VEERABANGSA, 1964).

5) La lactate déshydrogénase est une enzyme allostérique (d'AUZAC et JACOB, 1968b), aussi les variations du pH ont une très grande influence sur sa sensibilité à divers effecteurs : ATP (JACOB et d'AUZAC, 1967b), alanine (JACOB et d'AUZAC,

1968a), et sur son affinité pour les divers composants de la réaction (JACOB et d'AUZAC, 1968a).

— Il ressort, qu'*in vitro*, la glycolyse dans un sérum de latex filtré sur « Sephadex G 25 », est découplée par rapport au métabolisme général. Les produits terminaux obtenus : lactate, alanine et malate (figures 3 et 4 : essai 1), ne sont en effet, absolument pas métabolisés. La voie des hexoses diphosphates, dont on a vérifié que le fonctionnement général était proportionnel au temps et à la quantité de protéines sériques dans le milieu d'expérience, peut donc être considérée comme une séquence réactionnelle définie. Il a donc été possible d'envisager une notion de « Km apparents », intégrés à l'ensemble de cet enchaînement enzymatique et concernant les principaux effecteurs nécessaires à son fonctionnement. Il est important de noter que les différentes méthodes utilisées, analyses quantitatives des différents produits de la glycolyse en fonction de la concentration des facteurs étudiés d'une part (JACOB, 1969), étude cinétique de l'accumulation du NADH d'autre part (JACOB, d'AUZAC et LIORET, 1969), ont abouti à des résultats analogues. Ainsi la « Km glycolytique » du fructose a été estimée à 0,2 mM, celui du NAD⁺ à 0,06-0,07 mM, celui de l'ATP à 0,2 mM et celui du Mg⁺⁺ à 1,3 mM.

B) FACTEURS ET MÉCANISMES DE LA RÉGULATION GLYCOLYTIQUE DANS LE LATEX D'*HEVEA BRASILIENSIS*.

1. Intensité du fonctionnement glycolytique.

a) *Activité potentielle des enzymes.*

Parmi les facteurs capables de contrôler l'intensité du fonctionnement d'un enchaînement métabolique, l'activité potentielle d'une étape enzymatique, dans la mesure où elle représente un « goulot d'étranglement » par rapport à l'ensemble, peut jouer un rôle important. Ainsi il a été montré qu'il existait, dans certains cas, une corrélation excellente entre l'intensité du flux glycolytique et l'intensité maximale de fonctionnement de l'hexokinase (HINTERBERGER et al., 1961).

L'examen de la figure 1 montre que, *in vitro*, les enzymes situées en amont de la voie des hexoses diphosphates sont potentiellement bien moins actives que celles situées en aval. De ce fait, la phosphofructokinase, la fructokinase, l'hexokinase et l'invertase sont susceptibles de contrôler l'activité glycolytique au sein du latex. Il faut cependant être prudent en ce qui concerne les deux dernières enzymes citées dont la fragilité (d'AUZAC et JACOB, 1968a) a pu entraîner une certaine sous-estimation de l'activité potentielle lors des dosages. Néanmoins, les faibles concentrations, sinon l'absence, de glucose et de fructose dans le latex très frais (TUPY et RESING, 1968; JACOB, 1969) ne sauraient en aucun cas saturer l'hexokinase et la fructokinase, compte tenu de l'affinité de ces enzymes pour leur substrat (fig. 1). Il en résulte, qu'*in situ*, l'activité potentielle de l'invertase peut être un facteur limitant de l'intensité du catabolisme glucidique. Toutefois, les connaissances actuelles ne permettent pas de préciser cette hypothèse et, selon TUPY (1969), l'intensité réelle de l'activité invertase serait plutôt dépendante des variations du milieu, telles que celles du pH.

b) *Le pH.*

Il apparaît clairement sur la figure 2 que le pH a une influence certaine sur l'intensité de la glycolyse dans le latex. L'abaissement du pH de 7,5 à 6,7 (cette zone caractérise les divers pH que peuvent présenter, les échantillons de latex au moment de leur récolte) provoque une forte augmentation de la quantité de fructose U¹⁴C non utilisé en fin d'expérience.

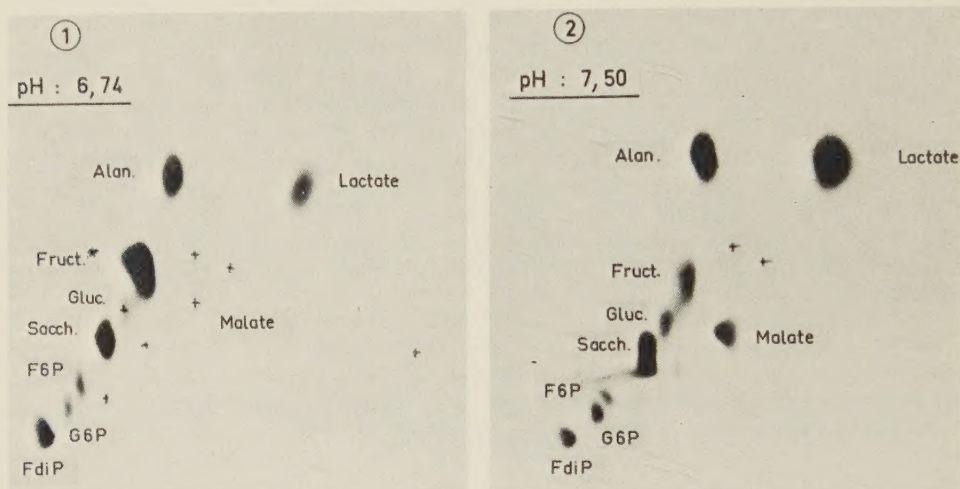


FIG. 2. — Influence du pH sur la glycolyse dans le latex d'*Hevea brasiliensis*.

50 mg de lyophilisat de sérum par ml, tampon phosphate de potassium 0,1 M; fructose U¹⁴C 2,5 μ Ci = 6 μ moles/ml; temps d'incubation 90 min; température 28 °C; essai 1 : pH 6,7; essai 2 : pH 7,5.

Parallèlement, l'examen des chromatogrammes fait également ressortir les points suivants :

— L'abaissement du pH de 7,5 à 6,7 influence l'accumulation d'alanine et de lactate, et fait varier le rapport alanine/lactate. Ce rapport, supérieur à 1 lorsque le pH est plus acide (il y a nettement plus d'alanine que de lactate accumulés, essai 1), est inférieur à 1 lorsque le pH est basique (la quantité d'alanine produite est alors visiblement moins importante que celle de lactate, essai 2). Les caractéristiques précédemment évoquées de la lactate déshydrogénase sont certainement une des causes de ce phénomène.

— La synthèse de malate très nette à pH 7,5, est totalement absente à pH 6,7. Cette synthèse implique le fonctionnement de réactions carboxylantes, concernant d'ailleurs dans le latex presque essentiellement le PEP (JACOB et d'AUZAC, 1967b). L'oxaloacétate produit est alors transformé en malate par l'intermédiaire de la malate déshydrogénase dont il faut rappeler l'énorme activité potentielle (fig. 1). Il est normal que la diminution de pH, en modifiant la concentration des différentes formes de CO₂ présents dans le milieu, et notamment en abaissant très fortement la concentration des ions bicarbonates, s'oppose aux β -carboxylations et, par leur intermédiaire, à la production de malate.

Le pH influe donc non seulement sur l'intensité de la glycolyse mais également sur son orientation métabolique. Il est difficile de dire quelle est l'import-

tance exacte de ce facteur dans les laticifères, mais il est vraisemblable qu'il se manifeste sous l'influence de phénomènes divers (évapo-transpiration, saignée, stimulation...) qui peuvent entraîner des variations de l'état physiologique de ces cellules et de certains de leurs organites tels que les lutoïdes.

c) *Magnésium et effecteurs divers.*

Le magnésium joue un rôle important et occupe une place privilégiée dans la régulation glycolytique au sein du latex, car il est au centre de la plupart des mécanismes mis en jeu. Sa présence est en effet nécessaire à toutes les réactions de phosphorylation mais aussi à l'isomérisation catalysée par l'énolase. Or, un certain nombre de composés sont susceptibles de former avec ce cation un complexe plus ou moins stable; c'est le cas des adénosines phosphates, du phosphate minéral et surtout du citrate (SILLEN et MARTELL, 1964). Il en résulte un équilibre extrêmement subtil entre les formes libres des divers composants et de leurs complexes magnésiens, équilibre qui peut aboutir à une carence apparente du cation dans le milieu, capable de modifier l'activité glycolytique. Par ailleurs, le calcium peut, par compétition, inhiber certaines réactions nécessitant du magnésium (LARDY et PARKS, 1956), et notamment celle catalysée par la pyruvate kinase du sérum de latex (JACOB et d'AUZAC, 1969).

α) *Magnésium et ATP.*

L'ATP peut jouer un double rôle dans la glycolyse au sein du sérum de latex (JACOB, d'AUZAC et LIORET, 1969) :

— un rôle essentiellement activateur lorsqu'il est en faible quantité et donc certainement sous forme de chélate ATP-Mg, véritable substrat semble-t-il de la phosphofructokinase de ce milieu (d'AUZAC et JACOB, 1968a);

— un rôle inhibiteur lorsque sa concentration devient élevée (> 1 mM) et qu'il peut être alors, en partie, sous forme libre. En réalité, il y a toujours peu d'ATP dans le latex ($< 0,3$ mM) (McMULLEN, 1960; JACOB, 1969). Il en résulte que l'inhibition par le cofacteur, considérée dans de nombreux organismes comme un mécanisme d'autorégulation du niveau énergétique cellulaire impliqué dans l'effet Pasteur (PHUNG NHU HUNG, 1967), ne se manifeste pas dans ce milieu. Il faut d'ailleurs rattacher ce phénomène à la faible sensibilité de la phosphofructokinase à l'action de l'adénosine triphosphate (fig. 1).

Par ailleurs, *in vitro*, aucun système enzymatique capable de synthétiser de l'ATP, autre que ceux de la glycolyse (phosphoglycérate kinase et pyruvate kinase), n'a pu être mis en évidence. La disponibilité en cofacteur est donc susceptible de contrôler l'intensité glycolytique, et la régénération de l'ATP à partir de l'ADP revêt une très grande importance. De ce fait, tout agent capable de freiner le fonctionnement de la phosphoglycérate kinase ou de la pyruvate kinase, directement (Mg^{++} en quantité insuffisante par exemple) ou indirectement (inhibition d'une étape enzymatique située en amont de ces deux kinases), peut entraîner secondairement une diminution de l'activité glycolytique par l'intermédiaire d'une carence d'ATP affectant le fonctionnement de réactions hexokinase et phosphofructokinase; cette carence peut, par exemple, provenir d'une certaine activité phosphatasique sinon ATPasique qu'il a été possible de mettre en évidence dans le latex (JACOB et d'AUZAC, 1968b).

β) Magnésium et citrate.

La figure 3 montre clairement les différentes étapes glycolytiques sur lesquelles agit le citrate et confirme certains résultats acquis lors de l'étude cinétique des divers enzymes (fig. 1).

Ayant présent à l'esprit le fait que la concentration en citrate du latex est souvent supérieure à 7,5 mM, il est intéressant de noter un certain nombre de

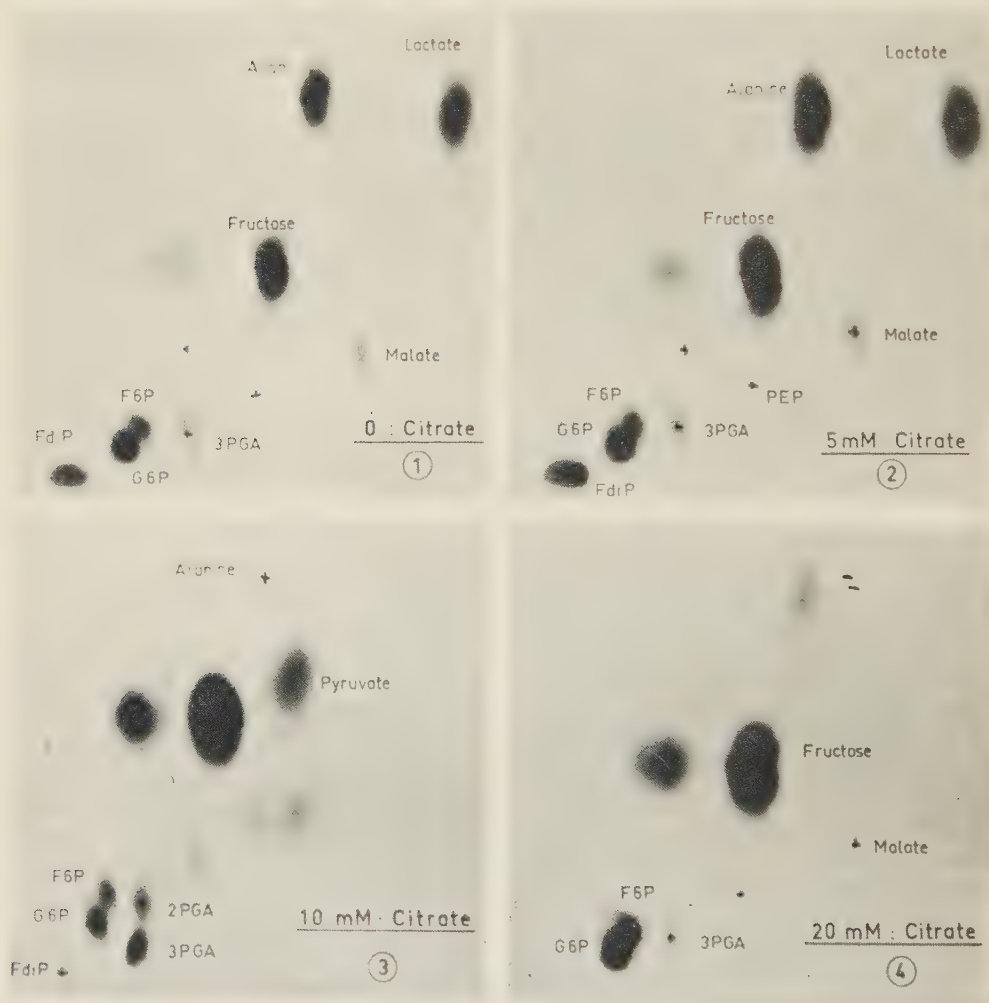


FIG. 3. — Influence du citrate sur la glycolyse dans le latex d'*Hevea brasiliensis*.

Protéines de sérum de latex filtrées sur « Sephadex G 25 » :

Tampon TEA 0,1 M pH 7,5; temps d'incubation 90 min; température 28 °C; ATP 0,5 mM; NAD 0,5 mM; Cl_2Mg 7,5 mM; phosphate de K: 12,5 mM; GSH: 2 mM; alanine: 5 mM; glutamate 10 mM; fructose U^{14}C 2,5 μCi : 5 mM; *essai 1*: témoin; *essai 2*: + 20 mM citrate; *essai 3*: + 10 mM citrate; *essai 4*: + 20 mM citrate.

phénomènes lorsque la concentration, dans le milieu réactionnel, atteint ou dépasse 10 mM.

— Il n'y a plus de production de lactate ni d'alanine, mais une certaine accumulation de pyruvate laisse supposer que le métabolisme du cétoacide est perturbé.

— L'accumulation de 2-phosphoglycérate (2PGA) et de 3-phosphoglycérate (3PGA) indique une forte inhibition de la pyruvate kinase (inhibition prévue dans la figure 1) mais aussi, dans une certaine mesure de l'énolase. Il faut noter que le phosphoénol pyruvate (PEP) du fait de sa labilité, est très difficilement mis en évidence avec les méthodes radiochromatographiques utilisées. Par ailleurs, la constante d'équilibre de la réaction catalysée par la phosphoglycérate mutase ($[3PGA]/[2PGA]$) supérieure à 10 (JACOB, 1969) explique la faible quantité et souvent même l'absence de 2PGA alors que l'accumulation de 3PGA peut être relativement importante.

— La disparition presque totale de fructose-1,6-phosphate (F di P), résulte vraisemblablement d'une diminution d'activité de la phosphofructokinase, dont le fonctionnement est toutefois encore suffisant pour permettre l'accumulation de produits ultérieurs (2PGA, 3PGA et pyruvate). Ces phénomènes ne sont pas visibles pour une concentration en citrate de 5 mM.

Dans l'essai contenant 20 mM de citrate, l'inhibition totale de la phosphofructokinase aboutit pratiquement à la seule accumulation de fructose-6-phosphate (F6P) et glucose-6-phosphate (G6P), montrant que le fonctionnement de la fructokinase n'est pas perturbé dans ces conditions. Faute de régénération d'ATP, la glycolyse s'arrête rapidement.

L'addition de magnésium en quantité suffisante lève totalement l'inhibition citrique (JACOB et d'AUZAC, 1968*b*) et souligne l'importance du rapport $Mg^{++}/$ citrate dans le sérum de latex en ce qui concerne le fonctionnement de la voie des hexoses disphosphates.

γ) Magnésium et calcium.

De l'examen de la figure 4, il ressort que le calcium est également un puissant inhibiteur de la glycolyse dans le latex. Lorsque la concentration en calcium atteint 0,5 mM, l'accumulation de 3PGA indique que le fonctionnement de la pyruvate kinase est fortement perturbé, mais pas suffisamment toutefois pour que la répercussion d'ensemble soit importante.

Dans l'essai contenant 1 mM de calcium, le phénomène précédent se trouve renforcé; on constate une légère diminution de la production de malate issu de la β -carboxylation du PEP (JACOB et d'AUZAC, 1967*b*), ce qui implique une certaine perturbation du fonctionnement de l'énolase.

Dans l'essai contenant 5 mM de calcium, l'accumulation des produits terminaux est beaucoup plus faible que dans les essais précédents et s'accompagne d'une diminution des quantités de fructose-1,6-phosphate, glucose-6-phosphate et fructose-6-phosphate accumulés. Ce phénomène traduit un fonctionnement hexokinasiq ue et phosphofructokinasiq ue plus faible dû, très probablement, à la régénération défectueuse d'ATP par la pyruvate kinase notamment.

Il a été reconnu que l'action du calcium se manifestait par compétition avec le magnésium vis-à-vis de certaines réactions telles que celle catalysée par la pyruvate kinase (MILDVAN et COHN, 1965) ou l'énolase (MALSTROM, 1955).

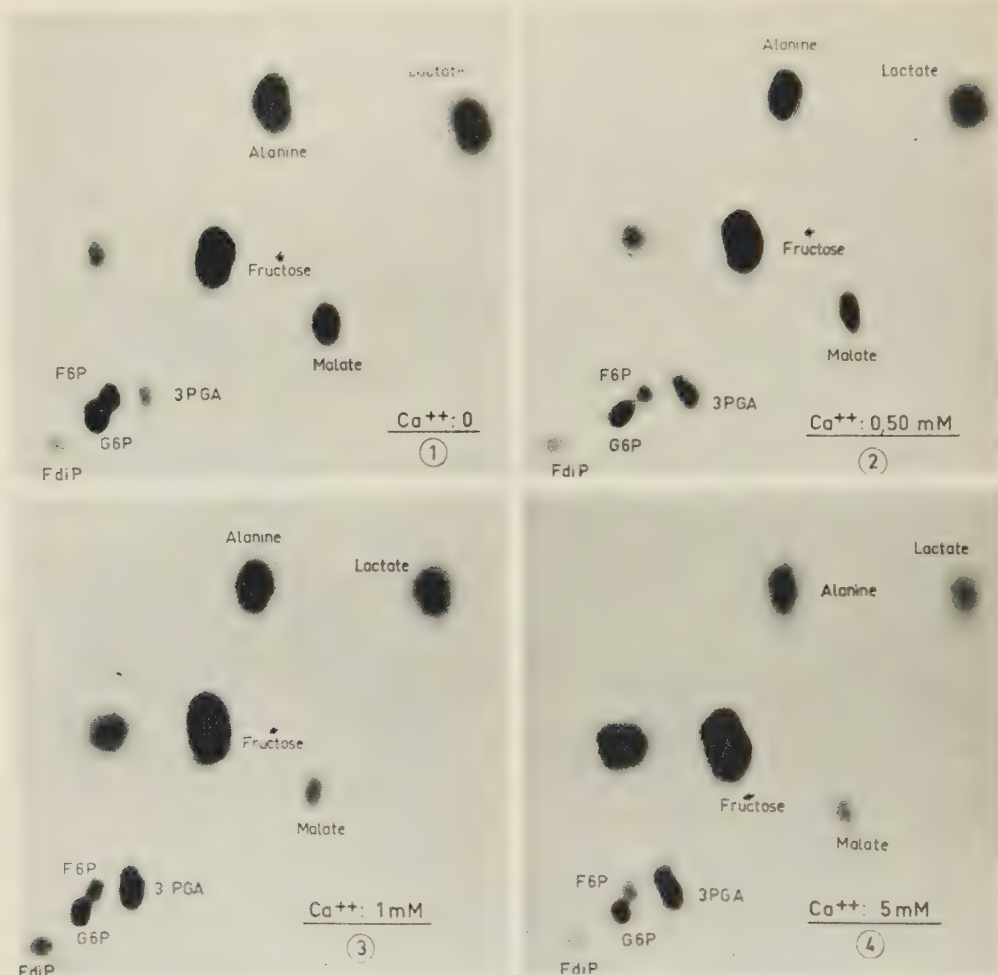


FIG. 4. — Influence du calcium sur la glycolyse dans le latex d'*Hevea brasiliensis*. Conditions expérimentales identiques à celles décrites figure 3.

essai 1 : témoin; essai 2 : +0,5 mM Ca^{++} ; essai 3 : +1 mM Ca^{++} ; essai 4 : +5 mM Ca^{++} .

Il faut donc conclure que le rapport des deux cations dans le latex a une influence certaine sur la glycolyse.

d) Discussion.

Il ressort que la pyruvate kinase joue un rôle primordial dans la régulation de la glycolyse au sein du latex d'Hévéa. La réaction qu'elle catalyse est la première perturbée par des effecteurs tels que le citrate ou le calcium dont les concentrations « *in situ* » peuvent être suffisamment grandes pour modifier fortement son fonctionnement. Par ailleurs, la bonne régénération d'ATP nécessaire aux réactions hexokinases, qui peuvent devenir des étapes limitantes d'autant

plus facilement que leur activité potentielle est faible, dépend de l'activité de la pyruvate kinase. L'énolase sensible aux mêmes agents que la pyruvate kinase doit aussi être considérée comme une enzyme pouvant modifier l'intensité de la voie des hexoses diphosphates.

Enfin, si l'on ne peut classer la réaction phosphofructokinasique comme une étape primordiale en ce qui concerne la régulation glycolytique, il faut admettre qu'elle est susceptible d'avoir, dans certaines conditions, un rôle qui peut n'être pas négligeable.

2. Orientation glycolytique.

La conservation du latex à 0 °C n'entraîne pas, du moins, durant les premières 24 heures, une diminution de l'utilisation du fructose (d'AUZAC et JACOB, 1968a). Par contre, très rapidement, la synthèse des acides organiques obtenus après incubation d'hexoses $U^{14}C$ est modifiée; notamment, la production de malate et de citrate disparaît totalement (fig. 5). Il faut remarquer, à ce propos, que dans un latex très frais, l'accumulation de malate est bien supérieure à celle du lactate (fig. 5, essai 1), contrairement à ce que l'on obtient dans un latex ou un

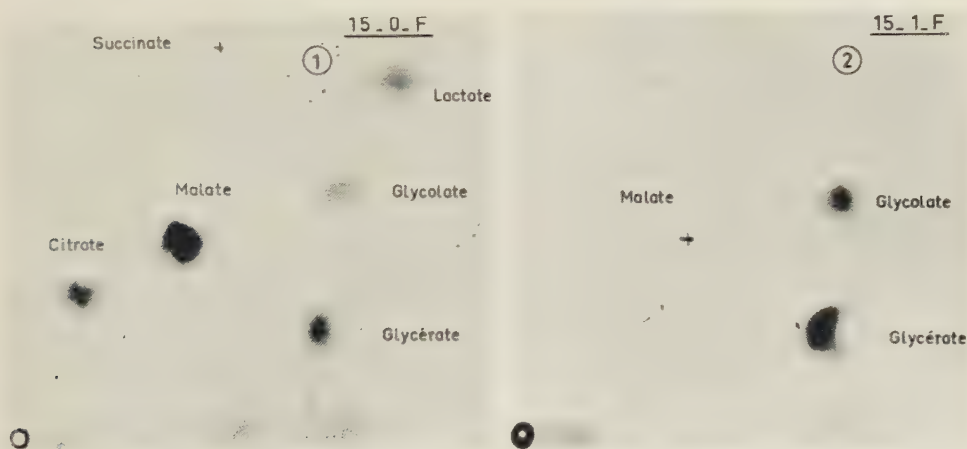


FIG. 5. — Influence du vieillissement du latex après sa récolte sur le métabolisme du fructose $U^{14}C$.

Radiochromatographie des acides organiques marqués obtenus.

Latex 1 ml, fructose $U^{14}C$: 5 μCi , temps d'incubation 90 min.

essai 1 : latex frais; essai 2 : même latex conservé 3 heures à 0 °C.

sérum de latex conservé même peu de temps ou stabilisé par lyophilisation (fig. 3 et 4, essai 1). Par ailleurs, dans ce dernier cas, aucune synthèse de citrate n'a jamais pu être observée lors d'incubation de fructose radioactif. Il est donc très probable que l'orientation glycolytique, *in situ*, est différente de celle caractérisant la glycolyse dans un latex ou un sérum, *in vitro*, utilisés après conservation. Les causes des modifications enregistrées sont certainement diverses et complexes : labilité de certaines enzymes, évolution du pH en fonction du temps, variation consécutive de la concentration en CO_2 dans le milieu, etc...

Après analyse, il semble que les mécanismes entrant en jeu dans la production du malate jouent un rôle important en ce qui concerne la transformation du pyruvate en acétate, transformation encore mal connue et qui rend compte de la liaison existant entre le catabolisme des sucres et l'anabolisme isoprénique.

La synthèse du malate et du citrate, *in situ*, est largement prouvée par les dosages de ces deux composés dont la concentration dans le latex dépasse souvent 20 mM (d'AUZAC, 1965*b*; JACOB, 1969). Or, la production de malate dérive de celle d'oxaloacétate issu, lui-même, presque essentiellement de la β -carboxylation du phosphoénolpyruvate (JACOB et d'AUZAC, 1967*b*).

L'acide oxaloacétique est réduit par l'intermédiaire de la malate déshydrogénase dont il faut souligner l'activité potentielle très élevée et le « Km » relativement faible (fig. 1). Si la quantité d'oxaloacétate formée est suffisante, le NADH disponible dans le milieu, et qui provient du fonctionnement de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, sera instantanément utilisé au dépend d'autres déshydrogénases : lactate déshydrogénase et alcool déshydrogénase, compte tenu de leurs activités potentielles bien plus faibles (cf. fig. 1). De ce fait, le pyruvate produit ne sera pas transformé en lactate mais susceptible d'être décarboxylé en acétate, soit directement (ce qui n'a pas encore pu être montré dans le latex), soit en passant par l'étape « acétaldéhyde » (JACOB et d'AUZAC, 1968*b*) sans être non plus, à ce stade, réduit en éthanol par l'alcool déshydrogénase. Dans le même temps, le CO_2 libéré peut éventuellement être utilisé par la, ou les réactions, de β -carboxylations aboutissant à l'oxaloacétate. La valeur relativement faible du rapport lactate sur pyruvate, dans divers échantillons de latex (JACOB, 1969), étaye cette hypothèse. Il faut aussi noter qu'une certaine accumulation de pyruvate est d'autant plus souhaitable, en ce qui concerne la production d'acétate par l'intermédiaire de la pyruvate décarboxylase, que l'enzyme a un « Km », pour son substrat, assez élevé (1,1 mM cf : fig. 1).

Par contre, si la synthèse d'oxaloacétate est trop peu importante, la quantité de NADH disponible dans le milieu pourra être suffisante pour que la lactate déshydrogénase produise du lactate en abondance (fig. 3, essai 1), et que l'acétaldéhyde éventuellement formé se transforme en éthanol (JACOB et d'AUZAC, 1968*b*). Ceci expliquerait la totale inhibition de la synthèse de radical acétyle pouvant être une des raisons de l'absence de synthèse citrique lors l'incubation, *in vitro*, d'hexoses U^{14}C .

Il est donc probable que de l'équilibre existant à un moment donné entre le fonctionnement de la β -carboxylation du phosphoénol pyruvate et la production de pyruvate, équilibre qui est, soulignons-le, en étroite relation avec le pH, va dépendre l'orientation glycolytique dans le latex, et notamment, la synthèse de radical acétyle précurseur du cis-polyisoprène.

IV — CONCLUSION

Le latex apparaît comme un milieu exceptionnellement propice à l'étude *in vitro* de la glycolyse, tant en ce qui concerne la simplicité du conditionnement et de l'utilisation de ce matériel végétal, que la possibilité d'y faire fonctionner

seule la voie des hexoses diphosphates à l'exclusion de tout autre enchaînement métabolique. Il est évidemment très difficile de relier les résultats acquis à l'activité glycolytique *in situ*. Toutefois, le schéma de fonctionnement élaboré a néanmoins une valeur heuristique. Il permet de dégager les caractéristiques importantes de l'enchaînement métabolique, d'éclairer les mécanismes probables de sa régulation, tant en ce qui concerne son intensité que son orientation. Ce schéma, dans son ensemble, est proche de celui qui caractérise le règne végétal en général. Ainsi la pyruvate kinase joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'activité glycolytique, mais aussi l'invertase, et si la phosphofructokinase est sensible à un certain nombre d'effecteurs, elle ne l'est pas suffisamment pour être un maillon primordial dans les mécanismes de régulation mis en jeu.

Par ailleurs, quelques caractères de la voie des hexoses diphosphates dans le latex doivent être soulignés :

— modification possible de l'orientation de la glycose sous l'influence de divers facteurs, tels que le pH par exemple;

— importance du rôle joué par le magnésium; en effet, c'est par l'intermédiaire de ce cation, à la suite de phénomènes de complexage ou de compétition enzymatique, que le citrate ou le calcium, en agissant sur le fonctionnement de certains enzymes (et plus particulièrement celui de la pyruvate kinase) modifient l'activité glycolytique.

Mais il est intéressant de noter que les éléments minéraux et organiques cités : magnésium, calcium, citrate, ne sont pas seulement localisés dans la phase aqueuse du latex, mais aussi dans les lutoïdes et à des concentrations suffisamment élevées pour être susceptibles d'avoir une influence métabolique certaine (COOK et SECKAR, 1953; RIBAILLIER, 1969; JACOB, 1969). Or, si la destruction de quelques uns de ces organites, que les travaux de PUJARNISCLE (1969) ont permis d'assimiler aux lysosomes de la cellule animale, peut se produire *in situ*, il est de plus en plus probable aussi que ces particules sont capables, dans des conditions encore mal définies, d'accumuler ou de libérer ces divers effecteurs du fait de la variation de leur perméabilité membranaire (SOUTHORN, 1968). Ces processus doivent vraisemblablement s'accompagner de variations locales de pH. La répercussion de tels effets sur l'activité glycolytique peut donc être importante et représenter un facteur de régulation non négligeable. Par ailleurs, on connaît actuellement certains produits, utilisés en hévéaculture lors des traitements de stimulation de la production (acide naphtylacétique ou acide chloroéthylphosphonique), qui ont également pour effet de stabiliser les lutoïdes (RIBAILLIER, 1970); on peut donc imaginer que, par l'intermédiaire de tels produits, il soit possible d'influer favorablement, *in situ*, sur la glycolyse dont le bon fonctionnement est une des conditions nécessaires à un anabolisme isoprénique optimal.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur LIORET de la Faculté des Sciences d'ORSAY et Monsieur d'AUZAC, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences d'Abidjan, pour les critiques, les conseils et les encouragements qu'ils nous ont prodigués au cours de nos travaux.

BIBLIOGRAPHIE

- ARREGUIN B. et ROCK M.C., 1967. — Ciclo de las pentosas en el latex de *Hevea brasiliensis* Muell. — *Bol. Inst. Quím. Univers. nac. aut. de México*, **19**, 58-73.
- d'AUZAC J., 1964. — Mise en évidence de la glycolyse et ses relations avec la biosynthèse du Caoutchouc au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Rev. gén., Caout. Plast.*, **41**, 1831-1834.
- d'AUZAC J., 1965a. — Etude de quelques réactions métaboliques liées au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*, à la biogenèse du caoutchouc. *Thèse de Doctorat d'Etat (Sci. nat.)* Paris.
- d'AUZAC J., 1965b. — Sur quelques relations entre la composition, l'activité biochimique du latex et la productivité de l'*Hevea brasiliensis*. *Thèse de Doctorat d'Etat (Sci. nat.)* (2^e sujet) Paris.
- d'AUZAC J. et JACOB J.-L., 1967. — Catabolisme glucidique au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Rev. gén. Caout. Plast.*, **44**, 1515-1523.
- d'AUZAC J. et JACOB J.-L., 1968a. — Sur la régulation de la glycolyse dans le latex d'*Hevea brasiliensis*. *Nat. Rub. Conf. Kuala Lumpur* (sous presse).
- d'AUZAC J. et JACOB J.-L., 1968b. — Inhibition par l'ATP de la malate déshydrogénase, de l'alcool déshydrogénase et de la lactate déshydrogénase du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **50**, 143-156.
- BANCHI I., 1966. — De la participation de la voie des hexoses monophosphates à la desmolysse glucidique au sein du latex *in vitro*. *Inst. Rech. Caout. Vietnam. Arch* n° 7/66.
- BERGMAYER H.U., 1963. — *Methods of enzymatic analysis*. Verlag. Chem. GMBH et Acad. Press.
- COOK A.S. et SECKAR B.C., 1953. — Fraction from *Hevea brasiliensis* latex centrifuged at 59000 g. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, **14**, 163-167.
- CROWLEY G.J., MOSES V. et ULLRICH J., 1963. — A versatile solvent to replace phenol for the paper chromatography of radioactive intermediary metabolite. *J. Chromato.*, **12**, 219-228.
- DENNIS D.T. et COULTATE T.P., 1967. — The regulatory properties of a plant phosphofructokinase during leaf development. *Biochim. Biophys. Acta*, **146**, 129-137.
- HINTERBERGER U., OCKEL E., GERISCHER-MOTHES W. et RAPOPORT S., 1961. — Grösse und pH Abhängigkeit der anderen Glykolyse und der Hexokinase Aktivität von Erythrocyten und Reticulocyten der Kaninchens. *Act. biol. med. germ.*, **7**, 50-56.
- JACOB J.-L., 1969. — Particularités de la glycolyse et de sa régulation au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Thèse de Doctorat d'Etat (Sci. nat.)* AO : 4129. Faculté des Sciences d'Orsay.
- JACOB J.-L. et d'AUZAC J., 1967a. — Sur l'existence d'une hexokinase et d'une fructokinase au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*. *C.R. Acad. Sci.*, Paris (série D), **265**, 260-263.
- JACOB J.-L. et d'AUZAC J., 1967b. — Action de l'ATP sur le métabolisme du pyruvate au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Bull. Soc. fr. Physiol. vég.*, **13**, 265-277.
- JACOB J.-L. et d'AUZAC J., 1968a. — L'alanine inhibiteur allostérique de la lactate déshydrogénase du latex d'*Hevea brasiliensis*. *C.R. Acad. Sci.*, Paris (série D), **266**, 631-633.
- JACOB J.-L. et d'AUZAC J., 1968b. — Influence de quelques facteurs sur la glycolyse et études préliminaires de la synthèse du citrate au sein du sérum de latex d'*Hevea brasiliensis*. *Rapport de recherches I.F.C.* n° 66.
- JACOB J.-L. et d'AUZAC J., 1969. — Sur quelques caractéristiques originales de la pyruvate kinase du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **51**, 511-525.
- JACOB J.-L., d'AUZAC J. et LIORET C., 1969. — Cinétique de l'accumulation du NADH. Moyen d'étude de la régulation de la glycolyse dans le latex d'*Hevea brasiliensis*. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **51**, 775-790.

- LARDY H.A. et PARKS R.E., 1956. — *Enzymes: biological structure and function*. Acad. Press., New York, p. 584.
- LYNEN F., 1968. — Biochemical problems of rubber synthesis. *Nat. Rub. Conf. Kuala Lumpur* (sous presse).
- MALSTROM B.G., 1955. — Metal ion specificity in the activation of enolase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **58**, 381-397.
- MEDINA A. et SOLS A., 1956. — A specific fructokinase in peas. *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 378-379.
- MILDVAN A.S. et COHN M., 1965. — Kinetic and magnetic resonance study of pyruvate kinase reaction. II: complexes of enzymes, metal and substrate. *J. biol. Chem.*, **241**, 1178-1193.
- MOSSBERG Y. et MAYER A.M., 1964. — Inhibition of glycolysis by adenosine triphosphate. *J. exper. Bot.*, **15**, 24-34.
- McMULLEN A.J., 1960. — Nucleotides of *Hevea brasiliensis* latex: the pyrophosphate components. *Biochim. Biophys. Acta.*, **41**, 152-154.
- NADARAJAH M. et VEERABANGSA M.T., 1964. — Mineral contents of unprocessed panels scraps. *Rub. Res. Inst. 1st and 2nd quaterly Journals*, **40**, 13-20.
- PHUNG-NHU-HUNG S., 1967. — L'effet Pasteur. *Physiol. Vég.*, **5**, 425-541.
- POGSON C.I. et RANDLE P.J., 1966. — The control of rat heart phosphofructokinase by citrate and other regulators, *Biochem. J.*, **100**, 683-693.
- PUJARNISCLE S., 1969. — Etude biochimique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*, Mull. Arg. — Différences et analogies avec les lysosomes. *Thèse de Doctorat d'Etat (Sci. nat.)* Orsay.
- RAPOPORT S., 1968. — The regulation of glycolysis in mamalian erythrocytes. In, « *Essay in biochemistry* », n° 4 CAMPBELL P.N. éd., 69-103.
- RIBAILLIER D., 1969. — Action *in vitro* de certains ions minéraux et composés organiques sur la stabilité des lutoïdes dans le latex d'*Hevea*. *Rev. gén. Caout. Plast.*, **45**, 1395-1398.
- RIBAILLIER D., 1970. — Importance des lutoïdes quant à l'écoulement du latex et à la productivité de l'*Hevea brasiliensis* Mull. Arg. Leur stabilisation par la stimulation hormonale. *Diplôme d'Etudes Supérieures*, Univ. d'Abidjan, Côte d'Ivoire.
- SAPICO V. et ANDERSON R.L., 1967. — An adenosine-5'-triphosphate hexo-6-phosphotransferase specific for D-mannose et D-fructose from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. biol. Chem.*, **200**, 145-154.
- SILLEN L.B. et MARTELL A.E., 1964. — Stability constants of metal ion complexes. (Spec. pub. n° 17). 2nd ed. London: *The Chemical Society*. 754 pp.
- SLOANE STANLEY G.H., 1961. — Pyruvate kinase — In, *Biochemist Handbook*. C. LONG éd., p. 390.
- SOUTHORN W.A., 1968. — Physiology of hevea latex. *Nat. Rub. Conf. Kuala Lumpur* (sous presse).
- TUPY J. et RESING W.L., 1967. — Substrat et métabolisme de la formation de gaz carbonique dans le latex de l'hévéa *in vitro*. *Rev. gen. Caout. Plast.*, **14**, 1525-1526.
- TUPY J. et RESING W.L., 1968. — Anaerobic respiration in latex of *Hevea brasiliensis* substrat and hunting factors. *Biol. Plantarum*, **10**, 72-80.
- TUPY J., 1969. — L'effet du 2-4-D et de l'acide 1-naphtylacétique sur la teneur et l'utilisation du saccharose et sur l'activité invertasique au sein du sérum de latex d'*Hevea brasiliensis*. *Opuscul Technique I.R.C.C.* n° 19/69.
- UNDERWOOD A.H. et NEWSHOLME E.A., 1967. — Some properties of phosphofructokinase from kidney Cortex and their relation to glucose métabolisme. *Biol. J.*, **104**, 296-299.
- WOLTER S., 1968. — Isolation and characterisation of two hexokinases with different specificity from *Oronectes umosus*. *Z. Naturforsch.*, **23**, 839-845.

